

Particle and method for the detection of antigens and/or antibodies using this particle.

Publication number: EP0126450

Publication date: 1984-11-28

Inventor: TRIPATZIS IOANNIS DR

Applicant: TRIPATZIS IOANNIS

Classification:

- **International:** G01N33/533; G01N33/543; G01N33/58; G01N33/533; G01N33/543; G01N33/58; (IPC1-7): G01N33/58; G01N33/54

- **European:** G01N33/543D; G01N33/58H

Application number: EP19840105650 19840518

Priority number(s): DE19833318261 19830519; DE19833322373 19830622

Also published as:

JP60035265 (A)
EP0126450 (A)
EP0126450 (B)

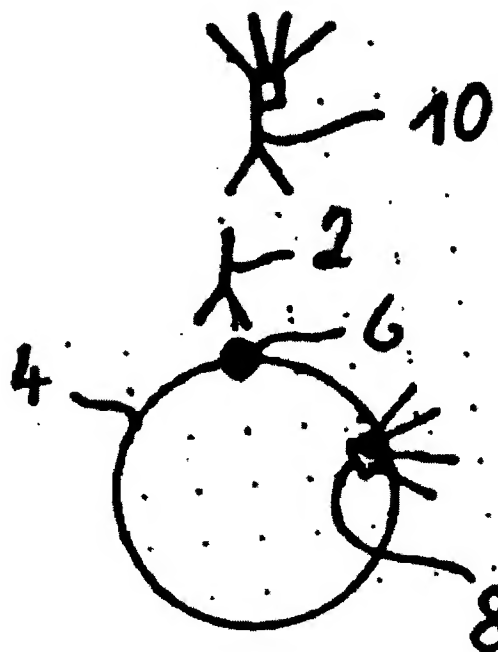
Cited documents:

US3853987
DE3000483
DE2632478
GB2123146

Report a data error he

Abstract of EP0126450

A method for the simultaneous detection of several antigens or antibodies in a fluid makes use of a mixture of particles which contains populations of particles which can be distinguished from one another in the following way: Each population has a combination, specific for it, of the following features: 1) fluorescent substances with different emission spectra, 2) quantity of these fluorescent substances, 3) particle size. Each particle population is furthermore loaded with a different type of antibodies or antigens. Use of this particle mixture makes it possible to carry out simultaneous investigation for several types of antigens or antibodies in a time- and effort-saving manner. The particle mixture is mixed with the fluid containing the antibodies or antigens to be detected. The subsequent reaction steps correspond to the steps in a conventional immunofluorescence method. Finally, a measuring device (e.g. flow cytometer) is used to measure the fluorescence (emission spectrum and intensity) and size of each particle. A computer identifies the particle on the basis of the measured data and assigns the measured immunofluorescence to a defined specificity.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平7-54324

(24) (44)公告日 平成7年(1995)6月7日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 8 1 D	9217-2 J		
33/533				

発明の数1(全 3 頁)

(21)出願番号	特願昭59-99727	(71)出願人	999999999 イオアニス・トリバトツイス ドイツ連邦共和国、ハノーバー1、レルヒ エンストラーセ、8
(22)出願日	昭和59年(1984)5月19日	(72)発明者	イオアニス・トリバトツイス ドイツ連邦共和国、ハノーバー1、レルヒ エンストラーセ、8
(65)公開番号	特開昭60-35265	(74)代理人	弁理士 江崎 光好 (外1名)
(43)公開日	昭和60年(1985)2月23日		
(31)優先権主張番号	P 3 3 1 8 2 6 1. 2	審判の合議体	
(32)優先日	1983年5月19日	審判長	高松 武生
(33)優先権主張国	ドイツ (D E)	審判官	井村 照雄
(31)優先権主張番号	P 3 3 2 2 3 7 3. 4	審判官	清瀬 良一
(32)優先日	1983年6月22日		
(33)優先権主張国	ドイツ (D E)		
審判番号	平5-23166	(56)参考文献	特開 昭57-19661 (J P, A)

(54)【発明の名称】 液体試料中の抗原および／または抗体を測定するための試験用剤

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】液体試料中の抗原及び（又は）抗体を測定するための、フローサイトメトリーに使用する試験用剤において、均一に形成された個々の担体からなる1種又は数種の1μmないし100μmの担体粒子の集団が、それらの発光スペクトルに関して異なる1種又は数種の蛍光物質の異なる濃度でそれぞれ標識付けされ、そしてそれぞれが異なった抗体及び（又は）抗原種によって負荷されうるまたは負荷されていることを特徴とする、上記抗原及び（又は）抗体の測定のための試験用剤。

【請求項2】担体粒子はほぼ球形であり、そして粒子集団内で同一の大きさを有する、特許請求の範囲第1項記載の試験用剤。

【請求項3】試験用剤が、異なった別個の寸法を有する多数の担体粒子を含有しており、これらの担体粒子はそ

2

れらの寸法に従って測定技術によって互いに区別されうる粒子集団へと結合されることができ、その際担体粒子の寸法が追加的な標識付けまたは区別付け特徴として用いられる、特許請求の範囲第1項～第2項のいずれかに記載の試験用剤。

【請求項4】担体粒子がプラスチック、ゴム、多糖類重合体（例えば寒天）、他の重合体またはガラスである、特許請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の試験用剤。

【請求項5】担体粒子が特定の抗原で負荷されており、そして検出すべき抗原が免疫反応によってこれらの抗体に結合されうる、特許請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の試験用剤。

【発明の詳細な説明】

本発明は、液体試料中の抗原および／または抗体を測定

するための試験用剤に関する。

抗原または抗体を検出するための各種の方法が知られており、これらは、原理的に凝集反応、沈降反応、補体結合反応、免疫蛍光法、ラジオイムノ反応、酵素免疫反応等に基づく。これらのすべての方法は、それぞれ一つの操作過程において抗原または抗体の1種のみしか確認できないという点において共通している。

しかしながら、しばしば、例えば健康者のスクリーニングテストの際に、感染症またはその他の疾病の判別診断のために、例えば血清学的な腫瘍の診断（いくつかの腫瘍抗原）の際に、またはアレルギーテスト（いくつかのアレルゲン）あるいは微生物の免疫状態を把握する場合に、数種の抗原または抗体が追跡される。従って、この従来技術によれば、求める抗原または抗体のそれぞれの種に対して別々の試験が行なわれる。このことは、何倍もの時間的ならびに物質的な出費を意味する。

本発明は、数種の抗原または抗体の試験および検出の際の時間的ならびに物質的な出費を減少せしめるという課題に基づいている。

この課題の解決は、特許請求の範囲第1項に規定された試験用剤を使用することによって可能である。種々の標識を用いて、混合物中の微粒子を区別することができる。この事実に基づいて、特許請求の範囲第1項による粒子に負荷されている抗原および抗体および試験される液体中の抗原および抗体の間の、蛍光測光法によって測定される免疫反応もまた、粒子の標識シグナルの組合せに対応する一定の特異性に整合される。

特許請求の範囲第1項による試験用剤の有利かつ合目的な実施態様が特許請求の範囲第2項～第5項に規定されている。

本発明によれば、混合物の区別しうる粒子への反応性抗原または抗体の整合により、免疫蛍光の測定によりそして標識の走査および分析により、抗原または抗体を検出することが可能である。

下記の例の参照の下に、本発明を更に詳細に説明する。その際、明瞭ならしめるために添付図面を引用する。抗体種2または16、例えば、 $Ak_1, Ak_2, \dots, Ak_j, \dots, Ak_n$ について血清が試験される。適当な担体物質（合成樹脂またはポリサツカライド重合体、例えば寒天）上の微粒子4、好ましくは直径約10ミクロンの球形の微粒子の群（集団）は、特許請求の範囲第5項に従ってそれぞれ1種類の抗原6または12、 $Ag_1, Ag_2, \dots, Ag_j, \dots, Ag_n$ が負荷される。それぞれの種類の抗原は、別々の種類の粒子に結合されており、粒子は次のような方法で予め標識付けされていた。

粒子4は、蛍光スペクトルが定着されそして蛍光測光により測定されうる物質8の組合せによって標識付けされる。標識は、個々の粒子集団を唯一つの関係標識物質によって決定され、しかし粒子集団対粒子集団を区別しうる濃度または数種の標識物質によって区別しうる濃度に

よって標識付けすることによって簡単な方法で行なうことができる。このような標識（それぞれの蛍光性物質の区別しうる濃度を有する標識）は、異なった放射スペクトルを有する蛍光物質の組合せによる標識と組合せることができる。次に評価は、放射された蛍光のスペクトルおよび/または強さに関して行なわれる。このようにして、2つの区別しうる濃度（規定された濃度の0%および100%）で使用された1種類の標識物質を用いて、2の1乗=2個の粒子集団が区別されうる（蛍光物質を有する粒子およびこの物質を有しない粒子）。3つの区別し得る濃度の物質の標識が用いられる場合、例えば規定された濃度の0%、50%および100%が用いられた場合には、3の1乗=3個の粒子集団が区別されうる。それぞれm種類の区別しうる濃度で使用された異なった放射スペクトルを有するn種類の標識物質を用いた場合、標識の可能性の数は、mのn乗であり、例えば、それぞれ10種の区別しうる濃度の3種の標識物質を用いた場合、10の3乗=1000個の異なった粒子集団が特徴づけられそして同定されうる。粒子の標識付けは、その製造の際またはその後に行なわれる。それぞれの種類の抗原（ A_{g_j} ）について、1種類の蛍光分光測光的にそして/またはその大きさによって定義されうる粒子集団 P_j が使用される。抗原および/または抗体は、化学的にまたは物理的に粒子に結合される。これは、それぞれの種類の抗原および/または抗体について別々に起る。その後で、所望の組成のすべての粒子が混合される。かくして、対応する抗原 $Ag_1, Ag_2, \dots, Ag_j, \dots, Ag_n$ が負荷された粒子 $P_1, P_2, \dots, P_j, \dots, P_n$ の混合物が生ずる。

この粒子混合物は、検出すべき抗体を含有する液体（例えば血清）と混合される。反応時間に応じて、検出すべき抗体16ないし2は、対応する抗原12ないし6に特異的に結合される。結合されなかった物質を除去するために洗浄液体を用いて粒子を洗浄した後に、粒子は、検出すべき抗体と特異的に反応する蛍光で標識付けされた抗体10の溶液と混合される。これらの蛍光で標識された抗体は、試験すべき抗体がそれから由来する動物種の抗体（それぞれの抗原特異性の）と反応する。抗体10が抗体16および/または2に結合される反応時間の後に、粒子は、結合されなかった蛍光標識された抗体を除去するために再び洗浄される。今度は、それぞれ個々の粒子に結合された抗体10の蛍光（起った免疫反応の測定パラメーターとしての免疫蛍光）と同様に粒子を同定する標識蛍光ならびに粒子の大きさが適当な測定装置によって測定される。そのためには、それぞれ個々の粒子の蛍光データ（および大きさもまた）を測定するフローサイトメトリ計（Durchfluss-Zytometer）が適当である。

測定データは、コンピューターによって処理され、その際免疫蛍光は、相当する粒子集団に整合される。この方法で、種々の抗原-抗体反応の輪郭 $Ag_1, Ak_1, \dots, Ag_n, Ak_n$ が確認される。

上記の方法は、試験すべき液体中の抗原12の検出に同様に使用される。その際、第一の反応および洗滌過程の後に、抗体16の混合物が試験すべきすべての抗原に対して加えられる。これらの抗体は、好ましくは抗体14とは異なった動物種から由来するものとする。再び反応および洗滌過程が行なわれた後に、抗体16と種属一特異的に反応する蛍光標識抗体10に添加される。測定は、抗体についての試験の際と同様に行なわれる。

本方法は、また次のようにして、フローサイトメトリーとは異なった方法で、実施することもできる：

粒子混合物を、載せガラス、例えばマイクロ滴定板の底板の上に固定する。次に試験すべき血清をこの載せガラス（粒子モザイク）の上に適用する。ある反応時間の後に、血清中に存在する抗体は、粒子上に存在する対応する抗原と結合する。結合しなかった物質は、次の洗滌によって除去される。

第2の過程において蛍光標識されたグロブリン抗体10が適用され、このものは試験すべき抗体2および／または16がそれから由来している動物種に特異的なものである。蛍光標識されたグロブリン抗体10が第2の過程において適用される。この第2の反応においては、蛍光標識されたグロブリン抗体10は、第1の反応過程において粒子4に結合された抗体（グロブリン）2および／または16に結合する。再度の洗滌の後に、未結合の物質が除去される。

上記の標本を、今度は、蛍光顕微鏡によって光度測定にかける。この顕微鏡は、ただ1個の粒子から放射された蛍光のスペクトルおよびその強度を把握しそして測定するように装備されている。この試験に際しては、蛍光顕微鏡の視野は、合目的的には予め規定された例えば直

線状の軌道に沿って、試験すべき載せガラス上に存在する粒子混合物の上を導かれる。これは、場合によっては相当する装置によって自動的に行なわれる。

測定データは、コンピューターによって評価される。試験された粒子は、この粒子中に含有された標識の蛍光スペクトルに基づいて、例えば粒子 P_j として同定される。それによって、グロブリン抗体から由来する測定された蛍光（免疫蛍光）は、免疫反応に整合（コーディネート）される。このようにして、多数の粒子の放射データが自動的に順次に記録されそしてコンピューターによって評価される。粒子の統計的分布によって、すべての粒子集団のデータが把握されそして処理される。かくして、種々の抗原-抗体反応 $Ag_1, Ak_1, Ag_2, Ak_2, \dots, Ag_n, Ak_n$ の輪郭が確認される。

粒子の標識の放射スペクトルは、巾広いスペクトルを有する光線（放射線）によって励起されるが、この放射スペクトルの一定のラインもまた一定の波長を有する放射線によって励起されうるかあるいは数個の分離されたラインが数個の一定の波長を有する光線、放射線によって励起されうる。

【図面の簡単な説明】

第1図および第2図は、本発明による粒子および方法を説明する概略説明図である。

各図において、参照数字は、下記のものを示す：

2, 16……抗体

4……粒子

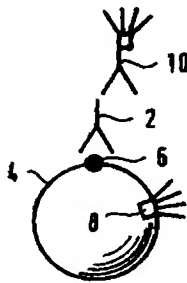
6, 12……抗原

8……標識物質

10……標識付けされた抗体

14……抗体

【第1図】



【第2図】

